

CAP 3

PULIZIE E SANIFICAZIONE DEI LOCALI E DELLE ATTREZZATURE

Roberta Barbaro – Rosanna Ciriminna

A.M.B.R.A. – NUOVA CASA DI CURE DEMMA, PALERMO

Introduzione

Per mantenere la qualità dell'aria richiesta negli ambienti a contaminazione controllata e per garantire la sicurezza degli operatori e dei prodotti, e quindi dei pazienti, è indispensabile un'adeguata pulizia e sanitizzazione dei locali di processazione. Risulta, quindi, necessario predisporre e mettere in atto procedure specifiche mirate a bilanciare da un lato il bisogno di lavorare in un ambiente pulito – decontaminato e dall'altro il rischio di esporre i gameti e gli embrioni ad agenti potenzialmente tossici o mutageni. Inoltre, la lavorazione di tessuti e cellule a contatto con un ambiente di specifica qualità e pulizia dell'aria è assolutamente indispensabile per minimizzare i rischi di contaminazione incrociata o contaminazione da parte di microrganismi (Allegato V Sezione D Punto 2 D.Lgs16/2010).

Tutto questo aspetto deve essere descritto nelle procedure del laboratorio di PMA e far parte del programma di formazione degli operatori (Allegato V Sezione D Punto 9 D.Lgs16/2010).

Questo capitolo affronta la tematica relativa alla pulizia e sanificazione del laboratorio di PMA, includendo anche la pulizia e disinfezione degli apparecchi e strumenti critici situati nel locale (Allegato V Sezione C Punto 4 D.Lgs16/2010). Infatti, tutte le attrezzature possono essere punti di raccolta di sporcizia e quindi possono rappresentare una fonte di potenziale contaminazione.

Materiali occorrenti

Per le procedure di pulizia e sanitizzazione si adoperano i detergenti, disinfettanti ed attrezzature varie (bastoni, aste, strofinacci, panni antirilascio monouso, etc.). Queste ultime devono essere di materiale pulibile, sterilizzabile in autoclave e dedicate all'area di utilizzo.

Di seguito sono descritte le classi di disinfettanti di uso più frequente nella routine dei protocolli di pulizia nei laboratori di PMA. Sono riportate anche informazioni generali sulle loro applicazioni e sulle precauzioni di sicurezza.

E' importante tener presente che la pulizia preventiva è essenziale per realizzare una corretta disinfezione e che molti prodotti germicidi sono attivi solamente su oggetti puliti. I tempi di contatto per i disinfettanti sono specifici per ogni singolo prodotto e marchio di fabbrica, pertanto

tutte le procedure d'uso dei disinfettanti devono essere conformi alle raccomandazioni del fabbricante.

I detergenti e disinfettanti impiegati devono essere approvati dalle Funzioni Responsabili del Centro e, per ciascun prodotto, devono essere disponibili, aggiornate ed opportunamente archiviate le relative schede di sicurezza e le schede tecniche (copia delle stesse deve essere fornita anche al personale incaricato per la pulizia del locale).

Composti dell'ammonio quaternario

Molti tipi di composti dell'ammonio quaternario sono usati come miscele, e spesso in combinazione con altri germicidi, come l'alcol. Hanno buona attività contro le forme vegetative dei batteri e dei virus con involucro lipidico. Alcuni tipi (come il benzalconio cloruro) sono usati come antisettici. L'attività germicida di certi tipi di composti dell'ammonio quaternario è notevolmente ridotta dalla sostanza organica, dalla durezza dell'acqua e dai detersivi anionici, ed è perciò necessaria molta cura nella scelta degli agenti per il lavaggio preventivo quando per la disinfezione si prevede l'uso di composti dell'ammonio quaternario.

Alcoli

L'etanolo (alcol etilico, C_2H_5OH) è attivo contro le forme vegetative di batteri, funghi, e virus con involucro lipidico, ma non contro le spore. La sua azione sui virus con involucro non lipidico è variabile. Per una più alta efficacia dovrebbe essere usato a concentrazione di circa il 70% (v/v) in acqua, ma concentrazioni più alte o più basse possono risultare inefficaci. Uno dei maggiori vantaggi delle soluzioni acquose di alcoli è che non lasciano residui sugli articoli trattati. Una soluzione acquosa al 70% v/v può essere usata sulla pelle, sulle superfici di lavoro dei banchi e delle cappe di biosicurezza e per immergere piccoli strumenti chirurgici. Gli alcoli sono volatili e infiammabili e non devono essere usati vicino a fiamme libere. Le soluzioni di lavoro devono essere conservate in contenitori idonei ad evitare l'evaporazione. Possono indurire la gomma e

dissolvere certi tipi di colla. Le bottiglie con soluzioni contenenti alcol devono essere chiaramente etichettate per evitarne il trattamento in autoclave.

Perossido di idrogeno

Come il cloro, il perossido dell' idrogeno (H_2O_2) è un forte ossidante ed un potente germicida ad ampio spettro. Però, risulta più sicuro del cloro per l'uomo e per l'ambiente. Il perossido di idrogeno o è fornito pronto all'uso come soluzione al 3%, o come soluzione acquosa al 30% da diluire 5-10 volte v/v con acqua sterilizzata. Le soluzioni di solo perossido di idrogeno al 3-6% hanno potere germicida relativamente lento e limitato. I prodotti ora disponibili contengono altri ingredienti che stabilizzano il perossido, accelerano la sua azione germicida e lo rendono meno corrosivo. Può essere usato per la decontaminazione di superfici del lavoro dei banchi di laboratorio e delle cappe di biosicurezza. Il perossido di idrogeno può essere corrosivo per i metalli come alluminio, rame, ottone e zinco e può anche decolorare stoffe, capelli, pelle e mucose. Gli oggetti così trattati devono essere sciacquati accuratamente prima di essere posti a contatto con occhi e mucose. Deve essere sempre conservato lontano dal calore e protetto dalla luce.

Routine di pulizia nei laboratori di PMA

Generalmente, nella routine dei protocolli di pulizia nei laboratori di PMA viene utilizzato uno dei disinfettanti appartenenti alle classi sopracitate. E' riportato, anche se con minore frequenza, l'impiego di più disinfettanti usati in combinazione, come ad esempio etanolo e composti dell'ammonio quaternario diluiti in acqua sterile. Inoltre, in alcuni laboratori viene impiegato un disinfettante diverso a secondo se il programma di pulizia da eseguire prevede una attività ordinaria o straordinaria. E' buona norma eseguire la pulizia straordinaria in un periodo "down" del laboratorio, cioè quando nessuna coltura in vitro di gameti ed embrioni è in corso.

Tra tutti i disinfettanti sopra elencati, l'etanolo al 70% risulta essere quello più frequentemente utilizzato da diversi anni. In letteratura, da diversi studi eseguiti per analizzare la quantità dei VOC (composti organici volatili) presente all'interno del laboratorio di PMA, è emersa un'associazione

tra le operazioni di pulizia ed il rilascio di contaminanti ambientali (ad esempio isopropanolo), che come è noto possono influenzare negativamente la coltura in vitro di gameti ed embrioni (J. Cohen 1997; Tien-cheng “Arthur” Chang 2010). Di conseguenza, tra tutti i disinfettanti conosciuti si consiglia di utilizzare i composti dell’ammonio quaternario poiché risultano efficaci e soprattutto non tossici per gameti ed embrioni (R. Janssens ESHRE 2007).

Modalità Operative

Solitamente la pulizia e sanitizzazione della cappa e delle apparecchiature sono effettuate dal personale del laboratorio di PMA, mentre la pulizia dei locali è affidata al personale addetto della Azienda o di società esterne. In ogni caso queste attività devono essere svolte da personale opportunamente addestrato, seguendo procedure operative definite. La ditta di pulizie deve osservare, per l’ingresso nel laboratorio di PMA, le stesse norme di comportamento e vestizione e quelle per l’introduzione dei materiali previste per il personale del laboratorio e per tutto il materiale che entra e esce dai locali a contaminazione controllata. Le operazioni di pulizia e sanitizzazione non devono essere condotte durante le attività produttive, a meno di eccezioni opportunamente giustificate. Le operazioni di pulizia devono interessare tutte le zone, anche quelle meno accessibili; per la pulizia delle superfici verticali (pareti, porte, finestre, ecc ...) è consigliabile iniziare sempre dall’alto e dirigersi verso il basso con movimenti verticali, non circolari; per la pulizia dei pavimenti, procedere sempre dal fondo del locale verso l’uscita dello stesso secondo strisce parallele; per la pulizia dei soffitti, procedere secondo strisce parallele. E’ opportuno incominciare la pulizia partendo dalle zone più pulite verso quelle più sporche, in modo che il panno venga a contatto con le zone più pulite nelle condizioni migliori, con movimenti unidirezionali (mai a zig zag o circolari), sovrapponendo fra di loro le passate di circa 2 cm. Durante le operazioni di pulizia bisogna utilizzare, laddove richiesto, gli opportuni D.P.I. (Dispositivi di Protezione Individuale).

Programma di pulizia

La pulizia prevede una attività ordinaria e una attività straordinaria.

Per la pulizia degli strumenti e delle superfici del laboratorio si consiglia di utilizzare i composti dell'ammonio quaternario poiché risultano efficaci e soprattutto non tossici per gameti ed embrioni (R. Janssens ESHRE 2007). Questi prodotti devono essere utilizzati rispettando le modalità di uso consigliate dalle aziende produttrici al fine di ottimizzarne l'efficacia.

Pulizia ordinaria

- **Ambiente**

La pulizia deve iniziare dalle aree più pulite per proseguire successivamente verso le aree più sporche. Il detergente/disinfettante non va applicato sulle superfici da pulire ma sui panni sterili. I panni vanno conservati nella loro confezione e tolti all'occorrenza in prossimità della zona da pulire. Il panno, piegato in quattro durante le operazioni, deve essere umido, non impregnato eccessivamente per limitare il più possibile la quantità di residui lasciati sulle superfici. Con frequenza giornaliera e al termine dell'attività lavorativa, tutti i contenitori destinati ai rifiuti speciali all'interno del laboratorio di PMA devono essere ritirati dal personale incaricato. I sacchi portarifiuti devono essere chiusi senza far fuoriuscire l'aria prima di essere tolti dal contenitore e trasportati fuori dal laboratorio.

Il programma di pulizia ambientale dovrebbe prevedere una frequenza giornaliera per la pulizia dei pavimenti ed una semestrale per le pareti, soffitti, scaffali, armadietti e lampade.

- **Piani di lavoro**

Le operazioni di pulizia ordinaria devono essere effettuate al termine di ogni fase di lavorazione intermedia (in funzione dei processi di lavorazione in corso) e al termine di ogni giornata di lavoro. Per le operazioni di pulizia ordinaria si raccomanda di utilizzare panni a basso rilascio inumiditi con il disinfettante/detergente.

- Cappa

La pulizia e disinfezione della cappa si deve effettuare alla fine della giornata lavorativa, inoltre in caso di versamenti accidentali di liquidi biologici ed ogni qualvolta si ritenga necessario (es. al termine di ogni procedura specifica di un paziente). Alla fine della giornata lavorativa si raccomanda di pulire con attenzione il piano di lavoro, le pareti interne ed esterne del vetro, utilizzando dei panni antirilascio monouso sterili e il disinfettante. Inoltre, tutti gli oggetti, incluse le attrezzature che sono all'interno della cappa, devono essere decontaminati e rimossi a fine lavoro, poiché i residui delle colture possono generare situazioni di crescita microbica. Al termine di ogni procedura specifica di un paziente (ad esempio tra due prelievi ovocitari di due pazienti diversi) occorre soltanto pulire il piano di lavoro.

Si consiglia di seguire scrupolosamente le indicazioni fornite dalla casa produttrice del disinfettante, per quanto riguarda le modalità d'uso ed i tempi di contatto.

Per quanto riguarda la pulizia più accurata delle cappe, che comprende anche la griglia di ventilazione del flusso laminare e la superficie grigliata sottostante, questa è registrata come intervento ordinario in base ad un programma di manutenzione prestabilito. Il tempo massimo che può intercorrere fra la fine delle operazioni di pulizia e l'inizio delle operazioni produttive (laddove la cappa sia mantenuta sempre chiusa), senza che sia necessario ripetere la pulizia della cappa, è di 15 giorni. Trascorso questo intervallo di tempo, devono essere effettuate le operazioni di pulizia utilizzando il prodotto previsto.

- Incubatori:

Le operazioni di pulizia ordinaria devono essere condotte almeno con frequenza mensile. Si consiglia di effettuare la pulizia dell'incubatore rispettando le istruzioni fornite dal produttore, sia per la routine di auto-sterilizzazione che per la disinfezione manuale ed a spruzzi. In quest'ultimo caso, si raccomanda di lasciare agire il disinfettante secondo quanto raccomandato dalla casa produttrice, impiegando sempre panni antirilascio monouso sterili ed acqua sterile. Da quando si effettua la pulizia ordinaria, è opportuno attendere due giorni prima di riutilizzare l'apparecchio nella routine clinica, per consentire una corretta stabilizzazione dei parametri, che dovranno essere comunque verificati prima dell'inizio dell'attività.

- Microscopi

In generale, il microscopio deve essere pulito alla fine di ogni giornata di lavoro e, in maniera più approfondita, alla fine di ogni settimana d'uso. La pulizia quotidiana consiste nella rimozione della polvere accumulatasi sulle lenti durante la giornata, nella pulizia della superficie del tavolino traslatore e dello sporco raccolto sulle lenti esterne degli oculari come conseguenza degli occasionali contatti con palpebre e ciglia.

Per questo tipo di pulizia è sufficiente rimuovere la polvere con un pennello molto morbido oppure con un getto d'aria compressa come quello che si può ottenere impiegando le bombolette per la pulizia delle macchine fotografiche e delle loro lenti. Per il tavolino occorre utilizzare un panno antirilascio inumidito con la soluzione del disinfettante.

La pulizia settimanale prevede più o meno le stesse procedure eseguite però anche all'interno dei tubi portaottiche, nella parte inferiore del condensatore, nel revolver portaobiettivi, nella parte inferiore della lente posta immediatamente dopo la fonte luminosa e di quelle parti del tavolino traslatore più "nascoste" e quindi meno facilmente raggiungibili nella pulizia quotidiana.

Si consiglia di coprire il microscopio, quando questo non è in uso, con la copertura di plastica che fa parte del corredo di accessori dello strumento; la polvere ambientale è infatti in grado di infiltrarsi in ogni fessura ed apertura del microscopio tappezzando letteralmente le lenti anche nella loro parte inferiore o all'interno dei tubi.

- Centrifuga

Non è richiesta una pulizia giornaliera della centrifuga eccetto nel caso di rottura accidentale di una provetta o nel caso di un versamento nella vasca. Settimanalmente o ogni qualvolta sia necessario, pulire il contenitore esterno, la vasca e gli accessori con un panno morbido inumidito con la soluzione del disinfettante prescelto, sciacquare gli accessori con acqua distillata ed asciugarli con carta assorbente soffice.

- Termoblock

Il termoblock viene pulito settimanalmente o all'occorrenza mediante un panno inumidito con la soluzione del disinfettante, risciacquando con acqua distillata e asciugando le superfici.

- Frigoriferi

La pulizia viene eseguita dall'operatore con frequenza semestrale o secondo necessità. Per le pareti esterne é sufficiente una pulizia con un panno asciutto, nel caso di macchie resistenti utilizzare dell'acqua calda, eventualmente dei disinfettanti/detergenti neutri, quindi sciacquare bene ed asciugare. Per le pareti interne procedere, ove necessario, allo sbrinamento per il vano congelatore senza sistema No Frost, mediante una spazzola dura senza utilizzare coltelli o altri oggetti metallici. Per la pulizia usare un panno inumidito con la soluzione di disinfettante, sciacquare bene con acqua distillata ed asciugare le superfici.

Pulizia straordinaria

Questo tipo di pulizia si effettua a seguito di eventi particolarmente inquinanti (manutenzione annuale dei filtri del laboratorio, mancanza di corrente con conseguente blocco dei flussi di aria o altro). Per la pulizia straordinaria si eseguono le stesse modalità della ordinaria. Anche in questo caso si deve fare attenzione a tutta quella apparecchiatura che ha funzioni critiche nella processazione, per la quale devono essere previste le situazioni che richiedono una pulizia straordinaria.

Per tutte le apparecchiature le operazioni di pulizia straordinaria possono essere previste:

- al termine di qualsiasi intervento di manutenzione ordinaria o straordinaria dell'apparecchiatura;
- in caso di rischio di contaminazione, dovuto ad esempio a versamento di liquidi potenzialmente contaminanti, materiali biologici, terreni o altri reagenti implicati nei processi produttivi.

Tabella riepilogativa esemplificativa di una possibile frequenza delle operazioni di pulizia ordinaria nei laboratori di PMA.

LOCALI/APPARECCHIATURE	FREQUENZA
Pavimenti	Giornaliera
Pareti, soffitti, scaffali, armadietti, lampade, etc.	Semestrale
Piani di lavoro	Giornaliera
Cappa	Giornaliera
Incubatori	Mensile
Microscopi	Giornaliera/settimanale
Centrifuga	Settimanale/quando necessario
Termoblock	Settimanale/quando necessario
Frigorifero	Semestrale

- **Validazione**

La validazione delle procedure di pulizia e sanificazione dei locali e delle attrezzature del laboratorio di PMA si effettua mediante analisi microbiologica. Infatti, il controllo della biocontaminazione consente di valutare il “grado di pulizia” di una determinata area e di tenere sotto controllo le fonti di contaminazione. Per i dettagli sulle modalità del controllo della biocontaminazione si rimanda al capitolo “controlli microbiologici” del manuale.

- **Documentazione riferita alle Operazioni di Pulizia**

Devono essere predisposte Procedure e Istruzioni Operative per le operazioni di pulizia e sanificazione degli ambienti e delle apparecchiature, che devono essere gestite nel sistema

gestione qualità del centro di PMA. Deve essere presente un elenco delle apparecchiature critiche. Per registrare le operazioni è opportuno redigere delle schede nelle quali riportare, oltre all'operatore che le ha effettuate, la data, il locale, lo strumento a cui ci si riferisce, nonché i prodotti utilizzati (Allegato V Sezione C Punto 4 D.Lgs16/2010).

Esempio di scheda per la registrazione delle operazioni di pulizia ambientale

DATA E ORA	PAVI- MENTI	PARETI, SOFFITTI	SCAFFALI, ARMADIETTI, LAMPADE ED ALTRO	PRODOTTO UTILIZZATO	OPERATORE	FIRMA

Riferimenti

- Norma di riferimento: UNI EN ISO 9001 § 6.4 Ambiente di lavoro.
- G.M.P. = Good Manufacturing Practices
- J Assist Reprod Genet. 2004 Mar;21(3):63-4. Cleaning protocols in the IVF laboratory. Elder K, Elliott T.
- Laboratory Biosafety Manual, terza edizione (2004). Organizzazione mondiale della sanità.
- Manuale per le Banche dei Tessuti (I edizione settembre 2009)
- Human sperm survival bioassay to examine toxicity of a new clinical laboratory equipment disinfectant. Tien-cheng "Arthur" Chang, PhD, ELD, Carlton A. Eddy, PhD, Ethan S. Jacoby, BA, Mario O. de la Pena, BS, Robert G. Brzyski, MD, PhD, and Robert S. Schenken, MD; poster ASRM 2010.
- Ambient air and its potential effects on conception in vitro. Jacques Cohen, Antonia Gilligan, William Esposito, Tim Schimmel and Brian Dale. Human Reproduction vol.12 no.8 pp.1742–1749, 1997.
- Novel sterilizing solution Fertisafe™ is effective and non embryotoxic; R. Janssens poster ESHRE 2007.
- Direttiva Europea 2004/23/CE
- Direttiva Europea 2006/17/CE
- Direttiva Europea 2006/86/CE
- D.Lgs. 06-11-2007 n. 191
- D.Lgs. 25-1-2010 n. 16
- D. Lgs. 85/2012